

Министерство образования Республики Беларусь  
УО «Полесский государственный университет»

**Т.Л. ЛЕБЕДЬ,  
С.Б. МЕЛЬНОВ**

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТИПИРОВАНИЕ  
ПОЛИМОРФИЗМОВ:  
ГЕНЕТИЧЕСКИЙ ПРОГНОЗ АНТРОПОМЕТРИЧЕСКИХ  
ХАРАКТЕРИСТИК СПОРТСМЕНОВ-ГРЕБЦОВ**

Методические рекомендации

Пинск  
ПолесГУ  
2016

УДК 575:796  
ББК 52.54:75.7  
ЛЗЗ

**Р е ц е н з е н т ы:**

доктор биологических наук Е.Г. Бусько;  
кандидат биологических наук Н.Г. Соловьева

**У т в е р ж д е н о**

научно-методическим советом ПолесГУ

**Лебедь, Т.Л.**

**ЛЗЗ Молекулярно-генетическое типирование полиморфизмов: генетический прогноз антропометрических характеристик спортсменов-гребцов : методические рекомендации / Т.Л. Лебедь, С.Б. Мельнов. – Пинск : ПолесГУ, 2016. – 25 с.**

ISBN 978-985-516-466-2

Настоящие методические рекомендации посвящены актуальной проблеме – повышению эффективности отбора в спорте высших достижений, благодаря внедрению инновационных молекулярно-биологических методов.

Разработаны для студентов специальности 1-88 01 01 «Физическая культура (по направлениям)», 1-88 02 01 «Спортивно-педагогическая деятельность (по направлениям)» по дисциплинам «Методы научного исследования в сфере физической культуры и спорта», «Теория и методика обучения спортивной подготовки в избранном виде спорта», «Медико-биологическое обеспечение подготовки спортсменов», «Спортивная медицина», для студентов специальности 1-31 01 01 «Биология (по направлениям)» по дисциплине «Методы работы с ДНК».

Рекомендации предназначены для тренеров, занимающихся подготовкой резерва, спортивных врачей и молекулярных биологов.

УДК 575:796  
ББК 52.54:75.7

ISBN 978-985-516-466-2

© «Полесский государственный университет», 2016

## ПРЕДИСЛОВИЕ

Приоритетным направлением социальной политики Республики Беларусь определено здоровье людей, развитие физической культуры и спорта. По словам Президента Республики Беларусь А.Г. Лукашенко здоровый образ жизни стал визитной карточкой Беларуси. Современная Республика Беларусь – спортивная страна, занимающая достойное место в двадцатке сильнейших стран мирового спортивного сообщества.

Большинство современных исследователей пришло к единому мнению: на протяжении двух последних десятилетий кривая рекордов стремится к максимальной величине, что свидетельствует о приближении к порогу адаптационных и функциональных возможностей спортсменов. Данный факт подтверждается ежегодным значительным снижением прироста результативности в спортивной деятельности. Предел нарастания таких основных физических качеств, как скорость и выносливость, предетерминирована генетическими структурами человека, т.е. спортивной одаренностью.

В современных условиях спорта высших достижений особую значимость приобретает раннее выявление наиболее одаренных, перспективных спортсменов, так как рекордные достижения демонстрируются именно теми, кто обладает наиболее оптимальными показателями, характерными для данного вида спорта. С одной стороны, спортсмены, отличающиеся по своим морфологическим, функциональным, психологическим особенностям, по-разному адаптируются к условиям деятельности, с другой – целенаправленная деятельность оказывает влияние на отбор наиболее одаренных спортсменов и на формирование у них специфического морфофункционального статуса.

Именно этим и обусловлена необходимость проведения селекции спортсменов на основе генетических исследований на раннем этапе тренировочного процесса, обеспечивающей выявление и отбор в национальные команды страны.

Таким образом, внедрение генетической диагностики в практическую деятельность спортивных врачей и тренеров позволяет не только оценить потенциальное здоровье спортсменов, но и наследственную предрасположенность к двигательной деятельности, физической работоспособности, устойчивость к физическим и психическим нагрузкам, а также темп прироста и предел физических качеств.

## ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### ***1. КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГРЕБНОГО СПОРТА***

Спортивное значение гребного спорта определяется прежде всего тем, что в процессе тренировки спортсмен развивает свои физические качества, приобретает жизненно необходимые навыки и умения и специализируется затем в одном из видов гребного спорта с целью достижения наиболее высоких спортивных результатов.

В различных видах гребного спорта необходимо совершать определенный комплекс действий, которые обеспечивают движение лодки. Эти действия обеспечиваются обязательной высокой координацией движений частей тела гребца и должны строго совпадать по времени с отдельными фазами гребного цикла, обеспечивая тем самым наиболее высокий коэффициент полезного действия энергетических затрат спортсмена. Для всех видов гребли очевидны некоторые общие закономерности всех элементов гребного цикла.

Цикличность – это выполнение множества однородных циклов движений, которые приводят к автоматизации действий спортсмена в лодке в процессе тренировки и во время соревнований. Цикличность обеспечивает высокую эффективность действий спортсмена в лодке в целом цикле, а также и в выполнении отдельных элементов гребного цикла. Спортсмен должен владеть умением варьировать интенсивность своих усилий в зависимости от хода соревновательной борьбы и тактических приемов.

Во время выполнения каждого полного цикла происходит поочередное сокращение и расслабление мышц, что обеспечивает высокую работоспособность спортсмена. Такое чередование достигается путем совершенствования нервно-мышечного аппарата человека в процессе длительного занятия гребным спортом.

Скелетные мышцы человека обладают высокой степенью пластичности в стрессорных условиях различного характера.

При выполнении физических нагрузок аэробного, анаэробного или смешанного характера, при иммобилизации конечности, в состоянии детренированности, а также в условиях переменного ускорения изменения в мышечных волокнах должны включать увеличение или уменьшение образования соответствующих белков. В свою очередь, изменения количества и состава белков вызваны преобразованиями, происходящими на уровне ДНК и РНК мышечных волокон. Благодаря последним достижениям в области геномных технологий сегодня стало возможным понять, каким образом и в какой степени в мышечных волокнах происходит генная экспрессия, лежащая в основе пластичности скелетных мышц. Тренировки, направленные на развитие выносливости либо скоростно-силовых качеств, представляют собой разные по стимулам внешние воздействия, которые приводят к специфическим структурным и метаболическим сдвигам в клетках скелетных мышц.

Установлено, что при тренировке на выносливость повышается способность мышц к окислению липидов и углеводов, увеличивается содержание миоглобина, гликогена и триглицеридов в мышечных волокнах, увеличиваются размеры и количество митохондрий, количество капилляров, приходящихся на одно мышечное волокно, повышаются способности митохондрий к окислительному ресинтезу АТФ, увеличивается использование липидов как энергетического топлива, происходит избирательная гипертрофия медленных мышечных волокон, а также незначительная трансформация быстрых мышечных волокон в медленные; в итоге повышаются аэробные возможности организма. С другой стороны, тренировочные занятия, направленные на развитие силы, мощности или скорости, оказывают незначительное влияние на аэробные возможности.

Адаптация к спринтерской и силовой тренировке происходит за счет значительного увеличения площади анатомического поперечника скелетных мышц, повышения содержания креатинфосфата и гликогена, а также гликолитических способностей, улучшения буферных свойств мышц и снижения

митохондриальной плотности, что приводит к повышению силы и способности к выполнению физических упражнений высокой интенсивности.

Таким образом, разработка методических рекомендаций по применению молекулярно-генетических методов исследования для выявления особенностей адаптации организма спортсменов к физическим нагрузкам позволит существенно повысить эффективность раннего отбора юных успешных спортсменов, а также предопределить их спортивную ориентацию.

## **2. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ**

### ***Ангиотензинпревращающий фермент (АСЕ)***

Ген АСЕ локализован в 17 хромосоме, кодирует аминокислотную последовательность ангиотензин-превращающего фермента, катализирующего протеолитическое расщепление ангиотензина I в ангиотензин II. Ген представлен более 100 аллельными вариантами, обуславливающими различную активность цинкметаллопептидаз, локализующихся на поверхности эпителиальных и эндотелиальных клеток различных тканей, включая почки и сердце. Аллель D характеризуется наличием делеции 287 п.о. по отношению к аллелю I. Установлено, что уровень АПФ, и, соответственно, физиологическая реакция организма, коррелирует с полиморфизмом I/D. В случае генотипа DD концентрация АПФ повышена, что обуславливает участие аллеля D в вазоконстрикции, повышении кровяного давления, ассоциации с артериальной гипертензией, деградации брадикинина, основного сосудорасширяющего вещества. В то же время установлено, что аллель D ассоциирован превалированием быстрых мышечных волокон с такими физическими качествами как скорость, сила, быстрота, а также приростом взрывной силы и скоростных качеств в ответ на анаэробные нагрузки, что обуславливает достоверные отличия встречаемости аллелей D и I в группах, соответственно, спринтеров и стайеров. Увеличение содержания быстрых гликолитических мышечных волокон сопро-

вождается мощными кратковременными сокращениями, обеспечивающими выполнение высокоинтенсивных упражнений. Гомозиготный генотип DD, генерируя ангиотензин II в повышенных количествах, является фактором синтеза структурных белков в клетках сердца, что при длительных нагрузках провоцирует гипертрофию сердца. Такой компенсаторный механизм рассматривается как защитная реакция организма, приводящая к ранней инвалидизации и преждевременной смерти спортсмена.

Однако установлено, что полиморфизм I/D детерминирует и антропометрические показатели. Таким образом, обнаруженные нами высокое значение мышечно-костного индекса и выраженная гипертрофия скелетных мышц (повышенные значения обхватных и габаритных показателей) у спортсменов обусловлены наличием делеции в гене ACE.

Наблюдения показывают, что индуцирование экспрессии транскриптов (VEGF, тенасцина-C, Angpt1, Angpt1R, COX4I1, COX4I2, HIF-1 $\alpha$ ), участвующих в ангиогенезе и митохондриальном энергетическом метаболизме в некоторой степени регулируется с помощью гипоксии, вызванной с участием ACE.

### ***Коактиватор 1-альфа рецептора активатора пероксисом (PPARGC1A)***

Ген PPARGC1A локализован в 4-й хромосоме и кодирует аминокислотную последовательность альфа-коактиватора гамма-рецептора, активируемого пролифераторами пероксисом, являющегося транскрипционным коактиватором множества транскрипционных факторов ядерных рецепторов, таких как PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , PPAR $\delta$ , TFAM,  $\alpha$ - и  $\beta$ -рецепторов эстрогена. Ген экспрессируется в мышечной, жировой и сердечной тканях. PPARGC1 $\alpha$  вовлечен в активацию термогенеза за счет увеличения потока протонов, увеличение количества митохондрий и их окисляющей способности, приращение соотношения медленных волокон, повышение секреции инсулина и, соответственно, окисления жиров и уровня свобод-



ных жирных кислот, а также снижение массы жировой ткани за счет снижения размеров адипоцитов.

Уровень активации, степень функциональной работы гена обусловлены его полиморфизмом. Наиболее изученным является Gly482Ser. Аллель Ser ассоциирован с низким уровнем экспрессии, что предетерминирует к ожирению, сахарному диабету II типа, снижению аэробных возможностей организма за счет меньшего потребления кислорода.

### ***Фактор транскрипции PPAR гамма-2 (PPARG2)***

Снижение активности гена обусловлено аминокислотной заменой в 12 кодоне пролина на аланин вследствие нуклеотидной замены С на G. У носителей аллеля Ala повышена чувствительность к инсулину мышечной и жировой тканей, сопровождающаяся анаболическим действием и повышением утилизации глюкозы, установлен гипертрофический эффект, что в комплексе ассоциировано с развитием и проявлением скоростно-силовых качеств у спортсмена.

В основе действия PPARG2 лежит регуляция обмена липидов и углеводов, что способствует переключению метаболизма с углеводного на жировой. Наличие С-аллеля коррелирует с высокой активностью липолиза, вследствие чего носители G обладают большим индексом массы тела, трудностями снижения веса на гипокалорийных диетах.

### ***Метилентетрагидрофолатредуктаза (MTHFR)***

Ген MTHFR (метилентетрагидрофолатредуктаза) локализован в 21-й хромосоме, кодирует аминокислотную последовательность фермента, катализирующего реметилирование гомоцистеина в метионин. Нуклеотидная замена цитозина на тимидин в 677 позиции гена, приводит к аминокислотной замене аланина на валин, сопровождающейся увеличением термолабильности фермента, снижением его активности более чем на 30 %, а также повышением уровня аминокислоты гомоцистеина и активности ренина плазмы. Системное пов-

реждение эндотелия сосудов, вызванное повышенным содержанием гомоцистеина, в комплексе с повышенной активностью ренина способствует развитию сердечно-сосудистой патологии, усилению перекисного окисления липидов, угнетению естественной системы антикоагулянтов.

На фоне гипометилирования происходит увеличение продольных и поперечных размеров мышечных трубочек, т.е. гипертрофия мышечных клеток. Носительство Т-аллеля обуславливает предрасположенность в спортивной деятельности.

### **3. *ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ (АНТРОПОМЕТРИЧЕСКИХ) ХАРАКТЕРИСТИК СПОРТСМЕНА***

Результативность в спортивной деятельности является симбиозом средовых воздействий и генетически обусловленных свойств и качеств человека. Зная генетически детерминированные в пределах нормы реакции размеры тела, его пропорции и под воздействием высоких физических нагрузок, организм спортсмена способен достигать высокой результативности.

Установление генетического потенциала каждого спортсмена позволит определить или уточнить молекулярные механизмы наследования как физических, так и психических качеств человека, что, в свою очередь, расширит теоретико-методическую базу процесса спортивной селекции.

Морфологические характеристики человека определяют склонность к занятиям различными видами спорта. К наиболее наследуемым признакам можно отнести продольные размеры тела и, соответственно, структуру костной ткани.

Так спортсмен с характерным данному виду спорта телосложением будет иметь значительно более высокие потенциальные возможности по сравнению с тем, у кого наблюдаются недостатки строения тела, компенсация которых возможна за счет развития двигательных качеств и техники. Гипертрофия мышечных волокон и увеличение их числа лежат в осно-

ве адаптации мышечного аппарата к высоким физическим нагрузкам.

Среди показателей, определяющих успешность выступления в гребле, одно из основных мест занимают показатели телосложения, которые учитываются при спортивном отборе на различных этапах многолетней подготовки, выборе дистанции, комплектовании экипажей, наладке посадочного места и т.д.

Такие показатели, как тотальные размеры тела, его пропорции, особенности телосложения, существенно влияют на физическую работоспособность, соревновательную деятельность, выбор спортивной специализации. Они имеют высокую наследственную обусловленность (**Табл. 1**), что наряду с учетом психологических, физиологических, биохимических факторов дает возможность определить перспективность спортсменов.

Специфические соматические типы гребцов различаются по трем показателям, которые обуславливают эффективность гребли (длина туловища, длина руки и ширина плеч). Отсюда, можно выделить три типа: тип с высоким туловищем; тип с длинными руками; тип с широкими плечами.

**Таблица 1 – Показатели влияния наследственности на антропометрические признаки**

<b>Признак</b>	<b>H<sup>2</sup>, %</b>
Длина тела	81–93
Масса тела	52–84
Индекс массы тела	44–90
Площадь поверхности тела	73
Окружность груди	77–89
Окружность бедра (костно-мышечная часть)	85

Есть другие типы юных гребцов: длинный – высокое туловище, длинные руки; широкий – широкие плечи, длинные руки; короткий – руки и туловище короткие.

Характерен еще один тип байдарочника и каноиста – это спортсмен, у которого длина опущенной руки от опорной

плоскости до кончиков пальцев в положении сидя больше, чем обычно. Такой тип спортсмена способен добиться высокой эффективности гребли.

Этот тип превосходит все другие соматические типы, если спортсмен имеет физическую и техническую подготовленность, соответствующую его физическому развитию.

Персональные особенности спортсмена и степень их разнообразия обусловлены полиморфизмом генов, вовлеченных процесс роста и обновления организма.

Аллель Ala гена PPARG2 ассоциирован с высоким ростом, который формируется благодаря нормальным работе сигнального пути инсулина, продукции инсулиноподобного фактора и дифференцировке остеобластов. Информативным является также и полиморфизм Gly482Ser гена PPARGC1A, аллель Ser которого предeterminирует остеогенез, благодаря снижению ингибирующего кооперативного действия комплекса белков PPAR $\gamma$ -PPARGC1 $\alpha$  на процесс образования костной ткани. Установлено, что селекция спортсменов-носителей T-аллеля гена MTHFR обусловлена большей степенью гипертрофии мышечных клеток, благоприятствующей занятиям спортом. Наличие аллеля D гена ACE обуславливает увеличение объема мышечной ткани, а также физических характеристик.

Влияние генотипа на длину тела изменяется в процессе индивидуального развития. Отмечается незначительное влияние генотипа на этот показатель у новорожденных. Масса и длина тела новорожденного зависят не столько от генотипа, сколько от внешней среды – материнского организма. Однако наследственные влияния усиливаются с возрастом. Так в дошкольном возрасте влияние наследственных факторов увеличивается, а в школьные годы (до пубертатного периода) наследственный контроль в развитии длины тела в основном стабильный и значительный. В период полового созревания влияние генотипа уменьшается. Снижение генетических влияний отмечается у девочек с 10 до 12 лет, у мальчиков с 11–13 лет. В этот период влияние внешней среды (воздействие физических упражнений) может быть эффективным, при

этом влияние генотипа на длину тела и др. антропометрические показатели и двигательные способности различаются у мужчин и женщин. Более выраженный наследственный контроль за развитием наблюдается у женщин.

Специальные тренировочные средства могут существенно повлиять на темпы развития морфологических признаков человека, испытывающих жесткий генетический контроль. Своевременное воздействие тренировочными средствами, в частности, в сенситивные периоды развития для данного признака, позволяет в пределах генетических границ развить морфологическую особенность человека в пределах верхних границ нормы реакции.

Таким образом, опираясь на результаты, изложенные в литературе за последние 10 лет, можно выявить комплекс ведущих молекулярных маркеров, способных прогнозировать антропометрические характеристики спортсмена, которые представлены в **Табл. 2**.

**Таблица 2 – Генетические маркеры антропометрических характеристик спортсмена**

<b>Полиморфизм</b>	<b>Ген</b>	<b>Аллель морфологического развития</b>
I/D	ACE	D
Gly482Ser	PPARGC1A	Ser
Pro12Ala	PPARG2	Ala
C677T	MTHFR	T

Наследственная обусловленность спортивной одаренности несомненна. В настоящее время признано, что высоких спортивных результатов может достичь лишь талантливый человек, обладающий определенным комплексом генетических предпосылок к данной деятельности.

## ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ

### *1. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК*

Выделение ДНК проводится методом лизирования клеток буккального эпителия додецилсульфатом натрия и деградацией белков протеиназой К. Для этого срезанный ватный тупфер, содержащий эпителиальные клетки, помещается в микроцентрифужную пробирку (1.5 мл) типа эппендорф, в которую последовательно вносятся 200 мкл буфера STE (100 mM NaCl, 10 mM Tris•HCl pH 8.0, 1 mM ЭДТА), 75 мкл 10 % раствора додецилсульфата натрия, 15 мкл раствора протеиназы К (20 мг/мл). Содержимое пробирки подвергается интенсивному встряхиванию в течение 5 мин. и инкубации в твердотельном термостате при 37 °С на протяжении 7–8 час.

Клеточный лизат обрабатывается 50 мкл 5М перхлората натрия и 300 мкл смеси хлороформа и изоамилового спирта (объемное соотношение 24:1). В результате интенсивного вортексирования (5 мин.) и центрифугирования (13 000 об/мин., 10 мин.) в пробирке формируются 2 фазы: верхняя – водная ДНК-содержащая, нижняя – органическая). Осторожно, не затрагивая границы раздела фаз, супернатант переносится в чистую микроцентрифужную пробирку (1.5 мл) и подвергается дополнительной обработке 300 мкл смеси хлороформа и изоамилового спирта. К полученной вновь ДНК-содержащей фракции, перенесенной в чистую микроцентрифужную пробирку (1.5 мл), вносится 96 % этанол, с целью преципитации ДНК. Для интенсификации процесса осаждения нуклеиновых кислот применяется вортексирование (5 мин.) и центрифугирование (13 000 об/мин., 10 мин.).

Удалив надосадочную жидкость, проводится промывка осадка 150 мкл 70 % этанола. Декантировав растворитель, пробирка с осадком выдерживается в горизонтальном положении с открытой крышкой в течение 30–50 мин. для окончательного испарения этанола.

К высушенному осадку нуклеиновых кислот добавляется 35–75 мкл буфера для ДНК (pH 7.5-8.0, 0.1–0.2 mM ЭДТА, 10 mM Трис•HCl). Смесь вортируется до полного растворения осадка, далее коротким центрифугированием жидкость сбрасывается в объем.

Стандартизация количества и оценка качества выделенных нуклеиновых кислот проводится с помощью спектрофотометра Nano Drop. Измерение оптической плотности приготовленного раствора ДНК проводится при длинах волн 260 и 280 нм, соответствующих максимумам поглощения молекул ДНК и белков. При необходимости методом разбавления рабочая концентрация раствора ДНК доводится до 50-100 нг/мкл. Образцы ДНК подвергаются исследованиям в том случае, когда соотношение оптических плотностей при длинах волн 260 и 280 нм находится в пределах от 1.8 до 2.0, что подтверждает высокую степень очистки нуклеиновых кислот от белков.

Выделенные по вышеописанной методике ДНК подвергаются разделению на аликвоты и замораживанию.

## **2. ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ (ПЦР)**

Каждой процедуре приготовления реакционной смеси предшествует подготовительный этап: все реагенты (за исключением Taq-полимеразы) за 20 мин. до начала достаются из холодильника и морозильной камеры, нагреваются, мягко встряхиваются и коротко центрифугируются. Для проведения ПЦР используются только одноразовые пластиковые наконечники с фильтром и пробирки типа эппендорф различного объема, микролуночные планшеты, стрипированные пробирки.

В состав реакционной смеси (Табл. 3), общий объем которой составляет 20 мкл, входят следующие компоненты: 10×ПЦР-буфер, смесь четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов (10 mM каждого), 50 mM раствор хлорида магния, прямой и обратный олигонуклеотиды (10 пмоль/мкл каждого), фермент Taq-полимераза (5000 ед/мл), деионизованная вода, выделенная ДНК (50–100 нг/мкл).

**Таблица 3 – Состав реакционной смеси для ПЦР**

<b>Компоненты реакционной смеси</b>	<b>Концентрация компонентов в реакционной смеси</b>	<b>Объем компонента, мкл</b>
10×ПЦР-буфер	1×	2,0
дНТФ	0,2 мМ	2,0
Раствор MgCl <sub>2</sub>	2 мМ	0,8
Прямой праймер	10 пмоль	1,0
Обратный праймер	10 пмоль	1,0
Taq-полимераза	0,5 ед	0,1
ДНК-матрица	2,5-5 мкг/мл	1,0
Вода деионизованная	до 20 мкл	12,1

Учитывая разнообразие пар олигонуклеотидов, ограничивающих соответствующие локусы генома (ACE, PPARGC1A, PPARG2, MTHFR), отличных по структуре и размеру, используется серия 10×ПЦР-буферов, рознящихся друг от друга значением рН, а также присутствующим одновалентным катионом (K<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) (**Табл. 4**).

**Таблица 4 – Разнообразие используемых ПЦР-буферов**

<b>Состав буфера</b>	<b>Определяемые полиморфизмы</b>
10×ПЦР-буфер (100 мМ Tris•HCl pH 8.6, 500 мМ KCl, 0,01% Tween 20%)	I/D ACE Pro12Ala PPARG2
10×ПЦР-буфер (100 мМ Tris•HCl pH 8.8, 500 мМ KCl, 0,01% Tween 20%)	Gly482Ser PPARGC1A
10×ПЦР-буфер (100 мМ Tris•HCl pH 9.8, 500 мМ KCl, 0,01% Tween 20%)	C677T MTHFR

Полимеразная цепная реакция осуществляется на амплификаторах (Biometra, Германия) планшетного типа с подогреваемой крышкой.

После внесения ДНК-матрицы пробирки с реакционной смесью оперативно помещаются в амплификатор. Амплификация проводится с «горячим стартом», в автоматическом режиме по заданной программе (**Табл. 5**).



**Таблица 5 – Температурно-временной режим ПЦР**

Этапы	Температура	Продолжительность этапа	Кратность, раз
Начальная денатурация	95 °С	5 минут	1
Денатурация	94 °С	30 секунд	}35
Отжиг	T <sub>отж</sub> <sup>*</sup>	30 секунд	
Элонгация	72 °С	30 секунд	
Финальная элонгация	72 °С	5 минут	1
Пауза	10 °С	∞	1

\*T<sub>отж</sub> – температура отжига праймеров.

Температура отжига пар олигонуклеотидов варьирует от 56 до 62 °С (Табл. 6).

**Таблица 6 – Особенности параметров режимов амплификации**

Полиморфизм гена	Состав олигонуклеотидов	Температура отжига, °С	Продукты реакции, п.о.
Alu I/D ACE	5'-CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT-3' 5'-GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT-3'	58	479 и/или 192
Gly482Ser PPARGC1A	5'-TGCTACCTGAGAGAGACTTTG-3' 5'-CTTTCATCTTCGCTGTCATC-3'	58	260
Pro12Ala PPARG2	5'-GACAAAATATCAGTGTGAATTACAGC-3' 5'-CCCAATAGCCGTATCTGGAAGG-3'	62	159
C677T MTHFR	5'-CCGAAGCAGGGAGCTTTG-3' 5'-GCGGTGCATGCCTTCACAA-3'	56	128

### **3. ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ ПРОДУКТОВ ПЦР**

Анализ длин амплифицированных фрагментов проводится электрофоретическим разделением в 2–3 % агарозном геле. Для получения агарозного геля необходимо расплавить 2–3 г агарозы в 1×TBE буфере (89 мМ Tris•HCl pH 8,3, 0,05 М ЭДТА, 89 мМ  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 10 мкл бромистого этидия 5 мг/мл) в СВЧ-печи в течение 3–5 мин. В охлажденную до 50 °С смесь добавить 2,5 мкл раствора этидиум бромид. Полученное содержимое перемешать и перенести в заливочный столик с предварительно установленными гребенками, позволяющим сформировать лунки объемом 10–15 мкл. Застывший и охлажденный гель извлечь и погрузить в 1×TBE буфер так, чтобы лунки полностью заполнились буфером.

В сформированные лунки агарозного геля поместить смесь из 5–8 мкл продуктов амплификации и 2 мкл буфера для внесения в гель (0,25 % бромхлорофеновый синий, 0,25 % ксиленианол, 40 % сахара в 1×TBE буфере). Параллельно в одну из лунок в соответствии с рекомендациями производителя внести маркер молекулярного веса (ДНК-маркер с шагом 50 п.о.). Далее гель поместить в электрофоретическую горизонтальную камеру (Biometra, Германия), заполненную 1×TBE буфером. После подключения камеры к источнику переменного тока (Biometra, Германия) в течение 10–20 мин. проводить электрофорез при условиях, когда напряженность электрического поля соответствует 10–15 В/см<sup>2</sup>. Полоса бромхлорофенового синего, входящего в буфер для внесения в гель, удалится от линии старта на 2–4 см.

Гель извлекается из камеры по окончании электрофореза и помещается на стекло УФ-транслюминатора системы гель-документирования (Vilber laurmat, Франция). Фрагменты амплифицированных ДНК, а также фрагменты ДНК-маркера проявляются в виде светящихся полос при облучении геля УФ-лампой. Наличие амплифицированных фрагментов, а также их размер (Табл. 7) верифицируются по

ДНК-маркеру. Отсутствие целевых продуктов ПЦР приводит к исключению образцов из дальнейших исследований и требует повторного проведения ПЦР.

В случае наличия однонуклеотидных замен, распознаваемых эндонуклеазами рестрикции, целевой ПЦР-продукт в дальнейшем подвергается ПДРФ-анализу.

#### **4. РЕСТРИКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ПРОДУКТОВ ПЦР**

10–12 мкл реакционной смеси, содержащей амплифицированные локусы ДНК, подвергаются ферментативной обработке эндонуклеазами рестрикции (Табл. 7).

**Таблица 7 – Перечень используемых ферментов и условия рестрикционного анализа**

<b>Полиморфизм гена</b>	<b>Эндонуклеаза рестрикции</b>	<b>Температура инкубации, °С</b>
Gly482Ser PPARGC1A	Msp I	37
Pro12Ala PPARG2	Bst UI	60
C677T MTHFR	Hinf I	37

Количество эндонуклеазы (4 ед.), состав рестрикционной смеси (1×буфер) и температурно-временной режим (15 мин.) инкубации определяются требованиями производителя ферментов (New England Biolabs, США).

#### **5. ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ ПРОДУКТОВ РЕСТРИКЦИОННОГО АНАЛИЗА**

Продукты рестрикционного анализа разделяются электрофоретически в 10 % полиакриламидном геле, который получают путем радикальной сополимеризации акриламида и N,N'-метилен-бис-акриламида при комплексном иницировании N,N,N',N'–тетраметилэтилендиамином и персульфатом

аммония. Для приготовления 1 пластины полимерного геля необходимо 20 мл деионизованной воды, 6 мл 50 %-ной смеси мономеров (50 г акриламида, 0,4 г N,N'-метилен-бис-акриламида в 100 г раствора), 4 мл 10×TBE буфера (890 mM Tris•HCl pH 8.3, 0,5 M ЭДТА, 890 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>), 50 мкл N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамина и 120 мкл 20 % персульфата аммония.

В сформированные лунки полимерного геля помещается смесь из 12–14 мкл продуктов рестрикционного анализа и 5 мкл буфера для внесения в гель (0,25 % бромхлорофеноловый синий, 0,25 % ксиленцианол, 0,25 % оранжевого G, 40 % глицерина в 1×TBE буфере). Параллельно в одну из лунок в соответствии с рекомендациями производителя вносится маркер молекулярного веса (ДНК-маркер с шагом 50 п.о.).

Далее пластины геля, заключенные между стеклами, помещаются в электрофоретическую вертикальную камеру (Biometra, Германия), заполненную 1×TBE буфером. После подключения камеры к источнику переменного тока (Biometra, Германия) в течение 1,5–2,5 час. проводится электрофорез. Полоса бромхлорофенолового синего, входящего в буфер для внесения в гель, удалится от линии старта на 15–17 см.

Гель извлекается со стекол по окончании электрофореза и помещается в емкость, заполненную 1×TBE, для обработки интеркалирующим реагентом (15–20 мкл раствора этидиум бромид (5 мг/мл)), после чего помещается на стекло УФ-трансиллюминатора системы гель-документирования (Vilber Lourmat, Франция). Фрагменты ДНК, а также фрагменты ДНК-маркера проявляются в виде светящихся полос при облучении геля УФ-лампой. Наличие всех фрагментов ДНК, а также их размер (Табл. 8) верифицируются по ДНК-маркеру.

**Таблица 8 – Визуализация и интерпретация результатов ПЦР и ПДРФ-анализа**

<b>Полиморфизм гена</b>	<b>Генотип</b>	<b>Продукты реакции, п.о.</b>
Gly482Ser PPARGC1A	SerSer	260
	GlySer	260, 148 и 112
	GlyGly	148 и 112
Pro12Ala PPARG2	ProPro	160
	ProAla	160, 81 и 79
	AlaAla	81 и 79
C677T MTHFR	CC	129
	CT	129, 67 и 62
	TT	67 и 62
Alu I/D ACE	DD	192
	ID	479 и 192
	II	479

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог вышеизложенному можно констатировать следующее:

1. На сегодняшний момент представляется возможным с учетом требований конкретного вида спорта подобрать молекулярно-генетическую панель, способную оказать помощь педагогам, тренерам и спортивным врачам в определении предрасположенности индивидов к занятиям определенными видами спорта, направленными на развитие многих физических качеств (спортивная ориентация и отбор), в повышении роста спортивных показателей за счет оптимизации и коррекции тренировочного процесса, и в профилактике различных заболеваний, связанных с профессиональной деятельностью спортсменов.

2. Анализ выше изложенных данных указывает на то, что оптимальный генетический профиль, предрасполагающий к успешности в гребных видах спорта, представляет собой сочетание аллелей D гена ACE, Ser гена PPARGC1A, Ala гена PPARG2, T гена MTHFR.

Следует отметить также, что генотипирование позволяет подтвердить эффективность многолетней системы спортивного отбора; оценить спортивную одаренность и перспективность детей; детализировать и учесть индивидуальные особенности спортсменов-гребцов, не вскрытые в результате стандартных мероприятий по обеспечению спортивного отбора, например, генетическую детерминацию антропометрических характеристик, развитие которых, достаточно индивидуально и слабо прогнозируемо в определенные периоды физического развития организма; провести целенаправленный отбор спортсменов на основе генетических исследований на раннем этапе тренировочного процесса; сформировать конкурентно-способный спортивный резерв; повысить соревновательную результативность, путем коррекции дистанции соревновательной нагрузки, а также вид игрового амплуа спортсмена и т.д.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ахметов, И.И. Ассоциация полиморфизмов генов-регуляторов с аэробной и анаэробной работоспособностью спортсменов / И.И. Ахметов [и др.] // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 2007. – Т.93. – С. 837–843.

2. Ахметов, И.И. [и др.] Полиморфизм гена MTHFR и мышечная деятельность человека / И.И. Ахметов [и др.] // Материалы I Всероссийского конгресса междунар. участия «Медицина для спорта», Москва (19–20 сентября 2011). – М., 2011. – С. 20–22.

3. Бакраган, З.С. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гомеостаза / З.С. Баркаган, А.П. Мамот ; изд. 2-е доп. – М.: Ньюдиамед, 2001. – 296 с.

4. Гомелля, М.В. Изменчивость генетических маркеров протомболитических нарушений при артериальной гипертензии у детей / М.В. Гомелля [и др.] // Якутский медицинский журнал. – 2010. – С. 86–89.

5. Дикхут, Г.Г. Генетика и пределы человеческих возможностей / Г.Г. Дикхут // Наука в олимпийском спорте. – 2004. – № 2. – С. 56–64.

6. Ильин, В.Н. Проблемы и перспективы развития молекулярной генетики физической активности / В.Н. Ильин, С.Б. Дроздовская // Спортивная медицина. – 2007. – № 2. – С. 10–19.

7. Макаров, С.В. [и др.]. Полиморфизм гена ангиотензинпревращающего фермента, альфа-актина-3 и антропометрические характеристики / С.В. Макаров [и др.] // Медицинская генетика. – 2007. – Т.6. – № 1 (55). – С. 43–47.

8. Нехвядович, А.И. Особенности генома белорусских пловцов высокой квалификации / А.И. Няхвядович // Научные труды НИИ физической культуры и спорта Республики Беларусь : сб. науч. тр. ; редкол.: А.А. Михеев (гл. ред.) [и др.] ; науч.-исслед. ин-т физ. культуры и спорта Респ. Беларусь. – Минск. – 2013. – Вып. 12. – С. 114–125.

9. Рогозкин, В.А. Полиморфизм гена PPARG и двигательная деятельность человека / В.А. Рогозкин [и др.] // Бюл-

летень экспериментальной биологии и медицины. – 2008. – № 11. – С. 567–569.

10.Сергиенко, Л.П. Основы спортивной генетики : учебное пособие / Л.П. Сергиенко. – Киев : Вища шк., 2004. – 631с.

11.Amir, O [et al.]. The ACE deletion allele is associated with Israeli elite endurance athletes / O. Amir [et al.] // Experimental Physiology. – 2007. – V. 92. – E. I.5. – P. 881–886.

12.Correlation of plasma homocysteine and mitochondrial DNA content in peripheral blood of healthy women / S. Lim [et al.] // Atherosclerosis. – 2001. – V. 158. – № 2. – P. 399–405.

13.Deeb, S.S. [et al.]. Pro12Ala substitution PPAR gamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity / S.S. Deeb [et al.] // Nat Genet. – 1998. – № 20 (3). – S. 284–287.

14.Genetic variation in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma 2 gene (Pro12Ala) affects metabolic responses to weight loss and subsequent weight regain / B.J. Nicklas [et al.] // Diabetes. – 2001. – Vol. 50 (9). – P. 2172–6.

15.Ischemic Stroke subtypes and thrombophilia in young and elderly Brazilian stroke patients admitted to a rehabilitation hospital / F.J. Carod-Artal [et al.] // Stroke. – 2005. – V. 36. – P. 2012–2014.

16.Jones A. Skeletal muscle RAS and exercise performance / A. Jones, D.R Woods // Int J Biochem Cell Biol. –2003. – Jun.– № 35(6) – P. 855–66.

17.Ling, C. [et al.]. Multiple environmental and genetic factors influence skeletal muscle PGC-1 $\alpha$  and PGC1-1 $\beta$  gene expression in twins / C. Ling [et al.] // J. Clin Invest. – 2004. – V. 114. – P. 1518–1526.

18.Masud, S. Effect of the peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  gene Pro12 Ala variant on body mass index : a meta-analysis / S. Masud, Y. Ye // J med genet. – 2003. – № 40. – P. 773–780.

19.Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and homocysteine-lowering effect of vitamin therapy in Singaporean



stroke patients / G.Y. Ho [et al.] // Stroke. – 2006. – V. 37. – P. 456–460.

20. Nazarov, I.B. [et al.]. The angiotensin converting enzyme I/D polymorphism in Russian athletes / I.B. Nazarov [et al.] // European Journal of Human Genetics. – 2001. – V. 9. – P. 797–801.

21. Plasma homocysteine levels, C677T polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase gene, plasma renin activity and cardiovascular risk / A. Reyes-Engel [et al.] // Am. J. Hypertens. – 2002. – V. 14. – № 4. – P. 154.

22. Wagner, H. [et al.]. Biomechanical muscle properties and angiotensin-converting enzyme gene polymorphism : a model-based study / H. Wagner [et al.] // Eur J Appl Physiol. – 2006. – № 9(5). – P. 507–15.

23. Williams, A.G. [et al.]. Bradykinin receptor gene variant and human physical performance / A.G. Williams [et al.] // J Appl Physiol (1985). – 2004. – № 96 (3). – P. 938–42.

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ .....	3
ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ.....	5
<b>1. КРАТКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГРЕБНОГО СПОРТА</b> .....	5
<b>2. ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ</b> .....	7
<i>Ангиотензинпревращающий фермент (АСЕ)</i> .....	7
<i>Коактиватор 1-альфа рецептора активатора пероксисом (PPARGC1A)</i> .....	8
<i>Фактор транскрипции PPAR гамма-2 (PPARG2)</i> .....	9
<i>Метилентетрагидрофолатредуктаза (MTHFR)</i> .....	9
<b>3. ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ (АНТРОПОМЕТРИЧЕСКИХ) ХАРАКТЕРИСТИК СПОРТСМЕНА</b> .....	10
ПРАКТИЧЕСКАЯ ЧАСТЬ .....	14
<b>1. ВЫДЕЛЕНИЕ ДНК</b> .....	14
<b>2. ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ (ПЦР)</b> .....	15
<b>3. ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ ПРОДУКТОВ ПЦР</b> .....	18
<b>4. РЕСТРИКЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ПРОДУКТОВ ПЦР</b> .....	19
<b>5. ЭЛЕКТРОФОРЕТИЧЕСКОЕ РАЗДЕЛЕНИЕ ПРОДУКТОВ РЕСТРИКЦИОННОГО АНАЛИЗА</b> .....	19
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	22
ЛИТЕРАТУРА .....	23

*Учебное издание*

Т.Л. Лебедь  
С.Б. Мельнов

**Молекулярно-генетическое типирование полиморфизмов:  
генетический прогноз антропометрических характеристик  
спортсменов-гребцов**

Методические рекомендации

Ответственный за выпуск *П.Б. Пигаль*

Редактор *Е.М. Митянок*

Подписано в печать 27.12.2016 г. Формат 60×84/16.  
Бумага офсетная. Гарнитура «Таймс». Ризография.  
Усл. печ. л. 1,51. Уч.-изд. л. 0,66.  
Тираж 42 экз. Заказ № 294.

Отпечатано в редакционно-издательском отделе  
Полесского государственного университета.  
2225710, г. Пинск, ул. Днепровской флотилии, 23.